

热击在植物组织培养的应用前景

梁海曼 周菊华

(杭州大学生物系, 杭州 310012)

热击 (heat shock) 研究, 最早见于 Ritosa (1962) [105] 热击可以引发膨松 (puff) 的报告。八十年代以来, 由于热击效应的广泛深刻, 特别是由于可以利用热击蛋白的发生来进行基因表达的基础理论研究, 热击研究日益受到人们的重视。目前关于热击的研究大体上集中在以下诸方面: 热击蛋白的合成和热击蛋白的生物学意义, 基因表达的调控, 组蛋白和非组蛋白的修饰, 热击对抗性的诱导及其机理, 热击效应的内外影响因素, 热击的生理影响, 热击对分裂、生长、分化的影响等。热击研究时大都采用动物材料, 颇多已属分子水平的工作。以高等植物为材料的热击研究工作, 目前还比较少, 因而远比动物方面落后。但是用植物材料进行的研究, 颇多为与促进组织培养效率相联系的应用基础研究, 因而有其特色。

就所收集到的文献看来, 热击在植物组织培养中的应用已经涉及细胞分裂, 胚状体发生, 抗性诱导等诸多方面, 如: 45℃ 5分钟处理促进水稻原生质体的细胞分裂, 提高植板率 (Thompson 等, 1987 [110], Shu 等, 1988 [101])。38—40℃ 40—45分钟处理提高油棕成熟胚的愈伤组织诱导率 (崔元方等, 1986) [4], 35℃ 15分钟处理提高水稻花药的愈伤组织诱导率 (Zapata和Torrizo, 1986 [120])。35℃ 16小时处理可以显著提高孢子甘兰的花粉胚状体得率 (Ockendon, 1984 [82])。38℃ 2小时处理可以提高烟草细胞对54℃胁迫的耐受能力 (Harrington 和 Alm, 1988 [46])。还有利用外植体和侵染微生物对高温的敏感性差异, 进行外植体的50℃ 2小时处理可以大幅度减少北美五针松老枝接种体的污染率 (Kaul 1986 [56]), 在体细胞胚胎发生方面还有不少热处理 1, 2, 3天可以显著促进发生率的报告 (Chiang等, 1985 [28], Munyon等, 1989 [73], 程井辰等, 1989 [6], Chuong 和 Beverford, 1985) [27]。这些处理从时间的长度来说, 一般已属于热胁迫 (heat stress) 范围。但也提示了热处理在体细胞胚胎发生, 在细胞分化方面的显著影响。我们对瑞香茎段愈伤组织进行40℃ 0.5小时处理也显著促进了愈伤组织的再分化等, 而且没有发生玻璃苗。热击在植物组织培养中应用的例子还不太多, 但是已经足以显示出它在植物组织培养中能够很好发挥作用的前景。Zuker等 (1983) [121] 报告, 在盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 热击诱导的基因簇和分化发育初所产生的是相同的, Vander Ploeg等 (1985) [112] 报告, 热击基因主导了某些寄生原生动物的 *Trypanosoma brucei*、*Leishmania major* 的分化。这些分子水平的工作, 再联系到热处理显著促进植物体细胞胚胎发生的许多例子, 热击对细胞分化的引发影响是特别值得注意的。

为了使热击处理能在促进植物组织培养效率方面更广泛更有效地发挥作用, 本文拟就如下三方面, 热击处理的生理生化效应, 植物组织培养中通过热击处理可能有助于解决的问题, 进行热击处理试验时需要注意的一些事项, 叙述我们的一些认识, 以利和同行们共同探

讨。

一、热击处理的生理生化效应

热击的生理生化效应是十分广泛的, 我们也已经有过一个综述(周菊华和梁海曼, 1990)^[1], 因此本文将限于和植物组织培养有关的方面进行介绍。

1. 热击影响物质的外流和内流 热击促进四季豆叶组织的电解质渗漏(Field, 1981)^[87], 促进龙葵种子电解质和大分子渗漏(Givelberg等, 1986)^[43]。热击使*Cuscuta sentapau* (菟丝子属)叶绿体内的 Mn 水平显著降低。热击还降低氨基酸的渗入高粱胚(Ougham 和 Stoddart, 1986)^[83], 以上这些例子表明, 热击影响膜状况促进了物质的外流, 热击抑制正常的蛋白质合成, 减少了氨基酸的渗入, 这些变化的结果是细胞内电解质等物质含量水平的降低。但是, 热击又促进 Ca^{++} 内流入玉米根细胞(Rincon 和 Hanson, 1986)^[94]。33℃ 2 小时处理使梨果实细胞悬浮培养物的吸收 Ca^{++} 增加 32%, 而且抑制剂的试验表明热击促进 Ca^{++} 吸收与呼吸无直接关系(Klein 和 Ferguson, 1987)^[61], 动物细胞方面的试验也表明热击使细胞内 Ca 含量增加(Schlesinger, 1986^[90]), 45℃ 10 分钟即使 $^{45}\text{Ca}^{++}$ 内流增加, 而这种 Ca 内流的增加和质膜磷酸肌醇降解磷脂酸积累呈线性相关(Stevenson 等, 1986)^[44], 看来, 热击影响质膜状况促进 Ca^{++} 内流是有一定普遍性的。因此, 热击不仅会使细胞内物质含量水平下降, 还有可能使某些物质的含量水平上升。这是在使用热击手段于植物组织培养时应该予以注意的。由于热击会影响离子的内流和外流, 热击影响细胞内不同种类的离子的含量水平的同时, 还会影响胞内 pH 值。如: 40℃ 1 小时处理使酵母细胞的胞质 pH 值由 6.2 降至 5.4 (Weitzel 等, 1987)^[115], 我们用 40℃ 0.5 小时处理瑞香茎段愈伤组织后测定介质 pH 值的结果, 显示介质 pH 升高 0.08 单位, 提示了热击处理可能降低胞内 pH 值。因此, 进行热击处理时, 可能还会影响胞内 pH 值, 也是应该予以考虑的。

2. 热击对呼吸作用的影响 38℃ 2 小时处理促进梨果实细胞悬浮培养物的呼吸强度(Klein 和 Ferguson, 1987)^[61], 热击诱导鳶尾鳞茎的交替呼吸。这些例子, 再联系到动物细胞方面的例子, 看来热击有可能促进呼吸作用, 但呼吸的增强是否会相应地增加有效能量的产生, 还有待进一步的研究。

3. 热击对酶活性和调节性物质含量的影响 热击处理诱导酵母合成 5 种新蛋白质(热击蛋白, Hsp), 其中 1 种为核糖核酸酶(Pfeffer 和 Schulz-Harder, 1985)^[88]。热击处理还会使酵母细胞的蛋白酶活化(Thomas 和 Lengyel, 1986)^[100]。热击处理抑制大麦籽粒糊粉层的 2-淀粉酶活性(Belanger 等, 1986)^[16]。热击使硝酸还原酶由活化型转变为不活化型(Kuznetsov 等, 1988)^[64]。热击影响过氧化物酶活性, 诱导红色面包霉具有高的过氧化物酶活性(Kapoor 和 Lewis, 1987)^[54], 增强黄瓜幼苗的可溶性过氧化物酶活性(Stermer 和 Hammerschmidt, 1984)^[103]。但我们在瑞香茎段愈伤组织的热击试验中, 热击却使过氧化物酶同工酶, 尤其是碱性过氧化物酶的活性显著下降。热击抑制番石榴的多酚氧化酶活性(Augustin 等, 1985)^[13]。以上例子显示, 热击对酶活性的影响是十分广泛的。其中值得特别注意的是: 热击诱导核糖核酸酶的形成和热击活化蛋白酶, 这些影响如果在高等植物普遍存在, 并能掌握其规律, 就有可能利用热击处理作为配合手段来调节植物组织培养中外植体的原有表达程序。热击会影响过氧化物酶和多酚氧化酶活性状况, 由于过

氧化物酶有IAA氧化酶功能(Ueng和Daly, 1985)^[111], 个别报告多酚氧化酶也能氧化IAA, 因此热击很可能会影响内源IAA水平这一点对于植物组织培养是重要的。

热击处理使玉米根中的谷胱甘肽水平提高1倍(Nieto-Sotelo和Ho, 1986)^[80]。谷胱甘肽在植物体内通常参与对胁迫的防御(浅田浩二和陈功祥, 1988)^[7], 因此热击处理提高细胞内谷胱甘肽水平是有实际意义的。热击处理还影响植物体内多种激素的水平和活性。如: 热击处理降低烟草根瘤培养物的内源生长素水平(Pence和Caruse, 1986)^[87]。但另有报告热击处理会使内源IAA水平上升(赵成章等, 1989)。我们热击处理瑞香茎段愈伤组织的试验结果也提示了热击促进内源IAA水平上升的可能性, 热击处理使玉米幼苗初生叶的内源细胞分裂素水平急剧下降(Caers等, 1985)^[22]。热击处理烟草根瘤培养物使内源细胞分裂素水平也有所下降(Pence和Caruse, 1986)^[87]。热击处理通过膜促进了细胞分裂素在雁来红幼苗更好地发挥作用(Elliott, 1982)^[35]。热击处理促进棉花叶圆片组织的ABA转变, 从而降低了内源ABA的水平(Radin和Hendrix, 1986)^[88]。热击处理, 可能通过失水而促进四季豆初生叶中ABA的积累(Eze等, 1983)^[86]。热击处理还会刺激梨悬浮培养细胞, 四季豆叶组织的乙烯产生(Klein和Ferguson, 1987)^[61]; Field, 1981^[87]。以上这些事例显然表明热击处理有可能显著影响植物体内的激素水平和相对比例, 这一点对于植物组织培养是十分重要的。还有报告热击处理会引发团藻产生性诱导剂(Kirk和Kirk, 1985)^[59], 这一事实对于植物组织培养中的花器分化研究可能是一条线索。

4. 热击对蛋白质修饰和基因表达的影响 已有的报告表明: 热击使番茄悬浮培养细胞的碱性核蛋白的磷酸化水平迅速下降, 使酸性核蛋白的磷酸化水平提高(Scharf和Nover, 1982)^[98]。热击使*Achlya ambisexualis*(绵菌属)的组蛋白H₃和组蛋白α(卵菌亚纲所特有的)高度磷酸化(Pekkala等, 1984)^[85]。热击强烈抑制叶绿体中类囊体蛋白质的磷酸化和Yordanov, 1986)^[106]。核蛋白质磷酸化程度的变化显然有可能影响染色质的存在状况。热击处理后促进小麦幼苗的甲硫氨酸的渗入蛋白质(Necchi等, 1987)^[79]。热击处理诱导水稻悬浮培养细胞专一合成多种Hsp, 其中89KD Hsp含甲基化氨基酸, 70 KD Hsp含大量甲基化精氨酸(Fourré和Lhoest, 1989)^[40]。Branno等(1983)^[18]在研究海胆核中组蛋白甲基化状况的报告中指出甲基化与发育有关。因此热击对甲基化的影响是值得注意的。动物材料方面还有报告, 热击诱导核心组蛋白强烈脱乙酰化, 阻遏组蛋白H₃、H₄甲基化, 而又诱导组蛋白H₂B的甲基化(Arrigo, 1983)^[12], 显示了热击对同一材料核心组蛋白的复杂影响。以上事例表明热击处理有可能对核内蛋白质的修饰产生比较广泛的影响, 因此热击的影响是比较深刻的。

关于热击对基因表达的影响, 植物方面的报告不多见。有报告, 热击处理立即抑制番茄细胞培养物中pre-rRNP的加工, 从而抑制了核糖体生物合成(Nover等, 1986)^[81]。热击处理时间延长则植物细胞培养物的核中的pre-rRNP物质部分降解(Scharf和Nover, 1987)^[98], 热击会使植物分泌细胞中原来稳定的mRNAs去稳定化(Brodl, 1989)^[20]。热击可以促进马利亚那云杉和短叶松原生质体在电激后的CAT基因的表达(Tantonnes等, 1989)^[108], 再联系到动物材料方面的一些报告: 热击可以引发特征性膨松(Ritosa, 1962)^[95]。热击引发的膨松的大小和Hsp的大小相关(Simen等, 1985)^[102]。热击会使染色质快速凝缩(Schlesinger, 1986)^[99]。热击使灯刷染色体快速收缩, 热击处理可以抑制

或促进基因表达是应该肯定的。问题在于影响规律还有待于掌握。

5. 热击对细胞分裂的调控 引言中已经指出了热击对植物细胞分裂的促进作用,这里只就动物材料进一步作些介绍。有报告指出:每一世代34℃ 30分钟热击处理一次,处理7次后,细胞同步分裂;同步分裂还与微管蛋白在细胞周期中的合成节奏相关(Bird和Zimmerman, 1981) [18]。热击处理后微管蛋白的合成出现二个高峰,一次出现在无处理时应该出现的时候,另一次出现在由于热击而被推迟的有丝分裂的直前(Carrino和Laffler, 1985) [23]。热击处理的实施是在G₁/S转换期时,则对DNA合成的启动和伸长起抑制作用(Davis等, 1983) [32]。热击诱导产生的89KD Hsp在正常细胞的增殖控制中起重要作用(饭田秀利, 1983) [8]。热击诱导产生的高分子量Hsp与细胞由增殖状态进入G₀期或维持G₀期有关(Iida和Yahara, 1984) [50]。以上这些事例表明,热击不仅可能促进细胞分裂,也会抑制细胞分裂,也可能利用热击对细胞分裂的抑制作用以促进同步分裂。

6. 热击和发育分化 引言中已介绍了热击对植物体细胞胚胎发生的影响,这里进一步以动物材料为主提供一些线索。一些由动物材料分离的细胞进入培养后,在对激素产生反应前很早就首先合成二种类似于70KD和85KD Hsp的蛋白质,培养胁迫蛋白。小鼠合子胚在二细胞初的阶段,发现一组新的蛋白质,其中主要的70KD蛋白和70KD Hsp相同(Bensaude等, 1983) [17]。酵母细胞孢子形成时有热击相关基因的表达(Kurtz和Lindquest, 1985) [63]。*Leishmania major* (寄生原生动物)通过昆虫媒介寄生于哺乳类体内后,由于寄主的体温,由鞭毛虫状转变为无鞭毛化,同时有热击基因的表达(Van der Ploeg等, 1985) [12]。番茄侧根尖分裂细胞有高水平Hsp 70样基因的转录,子房维管束、未成熟花药、胚等均有相同情况,作者认为Hsp 70族成员与发育调节有关(Duck等, 1989) [33]。热击促进鸢尾开花(Marrisen等, 1986) [74]。热击可使高粱由雄性不育转变为可育(张孔恂等, 1986) [2]。还有报告,不分化的畸胎瘤干细胞不能表达热击基因,一旦含有分化了的细胞簇时即对热击产生反应(Wittig等, 1983) [117]。以上事例都提示了发育分化早期的发育和Hsp的存在之间存在着某种联系,这是值得予以注意的。

7. 热击对抗逆性的影响 Tanguay (1983) [107]指出Hsp诱导和暂时耐热性的发展强相关。一些研究报告指出:40℃ 2小时或45℃ 10分钟处理明显提高大豆幼苗在28℃培养后再遇45℃时的耐受力,热击处理导致的Hsps积累与耐热性获得高度正相关(Lin等, 1984) [9]。38℃ 2小时处理可以提高烟草培养细胞对54℃胁迫的耐受(Harrington和Alm, 1988) [46]。38℃处理使豇豆培养细胞形成对热的适应时,产生70KD和80KD Hsp(Hensz-LaRosa等, 1987) [48]。关于Hsp在提高耐热性中的作用:大豆的Hsp,有的结合于多核糖体,作者认为Hsp保护多核糖体,防止在胁迫条件下翻译机器的破坏(Mansfield和Key, 1988) [73]。玉米根细胞中,Hsp有15~60%是与细胞器相结合,其中25KD, 72KD结合于Golgi体和内质网,18KD, 29KD, 72KD结合于质膜、线粒体、乙醛酸循环体,等(Cooper和Ho, 1987) [30],提示了Hsp和多种细胞器的正常功能有关。关于Hsp种类和耐热性的关系,多数报告重视70KD Hsp,但对不同品种小麦的分析显示,在耐热品种中普遍存在的是16KD, 17KD, 26KD等分子量较小的Hsp,作者认为低分子量Hsp和耐热性有关(Krishnan等, 1989) [62]。用动物材料研究的一些结果如下:41~44℃ 15~60分钟使BHK细胞产生了多种Hsp,其中仅70KD Hsp束缚于核基质,作者认为70KD Hsp在核中起结构作用,

在热胁迫时起保护核的作用 (Pouchelet 等, 1983) [80]。在哺乳类细胞, 核仁对高温非常敏感, Hsp 70 的存在加速细胞从高温的恢复, 作者认为 70KD Hsp 的功能之一是修复热胁迫损伤的前核糖体 (Pelham, 1986) [80]。对于小鼠神经胚芽瘤细胞, 热胁迫处理下的微管, 中间丝的重组需要 Hsp 的存在 (Van Bergenen Henegouwen 和 Linnemans, 1987) [114]。从以上一些事例看, 热击可以诱导在一定时期内的抗热性, 而这种抗热性的获得和热击蛋白对各类细胞器的保护和促进修复有关。

以上是对于热击处理的生理生化效应的基本了解。可扼要归纳如下: 热击处理影响膜改变胞内离子状况, 促进呼吸, 促进降解酶活性水平, 改变基因表达状况, 影响内源激素水平, 有利于发育分化, 提高短期抗逆性。这些基本影响将是我们考虑应用热击处理于植物组织培养的起点。

二、植物组织培养中通过热击处理可能有助于解决的问题

植物组织培养研究在近 20 年来的进展是迅速的, 在器官、组织、细胞、原生质体再生植株, 有效成份的生产, 组织培养育种和应用基础研究方面都已取得了很大成绩。但是离开真正掌握规律还有很大距离。

外植体进入培养后, 在大多数情况下首先遇到的就是脱分化启动和持续分裂的问题。脱分化启动和持续分裂, 在许多植物材料并不困难, 通过适宜的培养基和激素供应就可实现, 对于有些材料则并非如此。脱分化启动, 涉及消除或减弱原有表达程序引发新程序的问题。热击处理诸效应中有引发核糖核酸酶、活化蛋白酶、抑制正常蛋白合成、修饰核内蛋白质等作用, 这些都可能有助于抑制原有表达程序引发新表达程序。因此, 热击处理作为辅助手段配合试用于脱分化培养试验是有理由的。水稻原生质体培养, 在促进分裂提高植板率方面也已成功地采用了热击处理措施。

植物组织培养中的再分化研究近年来的一大趋势是诱导体细胞胚胎发生。本文已展示热击研究的许多报告都涉及到体细胞胚胎发生。热击诱导产生了多种分子量不同的 Hsp, 其中好些和以往陆续报告的胚胎发生蛋白, 70KD (Sung 和 Okimoto 1981) [106], 64KD、54KD、24KD (Chen 和 Luthe, 1987) [24] 蛋白是否相关是值得考虑的。热击处理影响多种内源激素的水平状况, 而一些报告表明体细胞胚胎发生过程中内源细胞分裂素水平 (Durley 等, 1984) [84], ABA 水平 (Kamada 和 Harada, 1981) [52] 等内源激素水平有显著变化, 这样, 利用热击这种快速处理手段来抑扬调节外植体 (培养物) 的内源激素水平可能是有益的。

外源激素供应是植物组织培养的基本技术措施。长期以来一直认为外源激素的供应是对内源激素不足的补充。但是, 近年来的一些报告表明情况并非如此简单, GA 的供应可以促进细胞内 IAA 的生物合成 (Law, 1987) [60], 供应乙烯使细胞内 GA 水平下降 (Pearce 等, 1988) [84], 供应 ABA 使细胞内的细胞分裂素水平下降 60~70% (Saha 等, 1983) [60], 外源 BA 处理会导致内源细胞分裂素外泄 (von Arnold 和 Grönroos, 1986) [113], 供应 BA 使细胞内的 ABA 水平下降 50% 以上 (黄海, 1987) [5], 低剂量的 2,4-D 供应使内源乙烯

水平剧降 (Garcia 和 Einset, 1983) [41] 等等。以上这些例子表明, 外源激素供应的一个重要作用是调整培养物的内源激素状况。其实, 培养基中的其他成份, 在许多情况下也起着调节内源激素的作用。热击处理的效应之一是影响内源激素状况。热击处理的特点是处理时间短反应快而撤除处理也容易。因此, 使用热击处理作为手段之一, 以调整内源激素状况是值得加以研究的。

抗性育种是植物组织培养研究的一个重要应用目标。热击处理可以获得短期提高抗逆性的效果是基本肯定的。能否在此基础上, 以热击处理作为配合手段之一进行抗逆性和抗性育种研究, 是值得予以考虑和试验的。

植物组织培养中的基本培养基, 通常总认为主要是满足培养物对营养供应的需求。但从培养基消耗情况的分析来看, 培养终了时, 糖和 P 已消耗完, N 仅剩 10% 左右而 K、S、Ca、Mg 均还剩 40~60% (MacCarthy 等, 1980) [11], 微量元素的消耗就更少, 因此外源无机盐供应的另一个主要的作用是维持细胞内适宜离子状况。我们近年来的一些分析工作表明, 水、琼脂、化学试剂中的杂质, 主要是微量元素, 对培养物细胞内矿质元素含量状况影响极大。热击处理会明显影响培养物的离子内流和外流, 若然, 热击处理是可以作为辅助手段应用于胞内离子水平调控的研究。

以上是我们对于热击处理在植物组织培养研究中可能发挥作用的一些认识。由于热击处理的生理生化效应是多方面的。而各种效应对一个具体培养目标不可能都是有利的, 这就需要在利用其有利影响的同时, 设法排除或弥补其不利影响。因此, 进行热击处理试验时是不大可能单靠热击处理一种技术措施就能获得十分显著的效果。需要注意并存因素的影响, 需要注意因素间的配合。

三、进行热击处理试验时需要注意的问题

热击处理作为一种技术措施是比较简便易行的。但是由于生物体对致死温度以下而高于正常生长温度的高温十分敏感, 热击的生理生化效应十分广泛, 从而处理温度和其他配合条件乃至材料自身状况的微细差异都可能导致热击效应不同。因此, 在应用热击手段于植物组织培养前, 对于可能影响热击效应的因素, 最好尽可能多了解。

1. 处理温度、处理时间和升温方式 不同的处理温度, 不同的处理时间, 骤然升温还是逐渐升温都会显著影响热击效应。如: 大豆幼苗, 40℃ 热击不促进渗漏, 45℃ 5 小时期间发生氨基酸可溶性糖、电介质的持续渗漏, 47.5℃ 7 分钟处理渗漏又较慢, 而 47.5℃ 前如先 40℃ 预处理 2 小时则可完全制止 47.5℃ 7 分钟所诱导的渗漏 (Lin 等, 1985) [68]。玉米幼苗根, 由 40℃ 或 45℃ 热击所诱导合成的 Hsp 是完全不同的 (Copper 和 Ho, 1983) [30]。玉米胚芽, 35℃ 以上的热击温度才能诱导合成 Hsp, 有些 Hsp 41℃ 15 分钟处理即可诱导产生, 有些 Hsp 需 41℃ 120 分钟处理才能诱导合成 (Baszczynski 等, 1982) [15]。豇豆培养细胞, 32℃ 36℃ 下均不产生任何典型的 Hsp, 38℃ 下则产生分别为 70KD 和 80KD 的二种 Hsp (Henss-Lakosa 等, 1987) [48]。孢子甘兰花药, 35℃ 48 小时处理不能获得花粉胚, 35℃ 16 小时处理则能诱导获得大量胚状体 (Ockendon, 1984) [82]。烟草培养细胞, 38℃ 2 小时预处理可提高细胞对 54℃ 胁迫的耐受, 42℃ 2 小时预处理则否; 又如 38℃ 预处理后立即 54℃ 胁迫, 细胞能生长但不太正常, 38℃ 预处理后 8 小时再 54℃ 胁迫则细胞能正常生长 (Harrington

和Alm, 1988) [45]。海生硅藻, 35℃ 60分钟或40℃ 10分钟+30℃ 60分钟, 诱导产生的Hsps是相同的(Lai等, 1988) [65]。胡萝卜悬浮培养细胞, 30℃ 3小时产生7种Hsp, 35℃ 3小时产生9种Hsp, 38℃ 3小时则产生10种Hsp, 91KD Hsp是在38℃热击下才产生, 又, 38℃下0.5小时仅产生91、84、39KD Hsp, 1.5小时则除上述四种外, 还诱导产生30、24.5、20.5、19.5、18、16KD Hsp (Hwang和Zimmerman 1989) [40]。大豆幼苗, 逐步升温时, 诱导Hsp合成所需热击温度比快速升温时高6~9℃, 而且二种情况下合成的Hsp的种类也不相同(Altschuler和Mascarenhas, 1985) [11]。水稻细胞培养物, 还逐渐升温至45℃, 诱导合成33KD Hsp, 快速升温至45℃则诱导合成70、89KD Hsp, 而且是甲基化的(Fourr'e和Lhoest, 1989) [40]。以上事实表明, 不同温度、时间和升温方式所诱导产生的Hsp是不同的, 生理效应也是不同的, 特别是Hsp的种类, 我们知道不同种类Hsp的生理作用是不同的, 因此, 在进行热击试验时还以系统地筛选出为研究目的所需要的适宜处理温度、时间和升温方式为妥。

2. 不同种类Hsp的合成时序和合成部位 热击后不同种类Hsp的合成不是同时, 也不是在细胞内的同一部位进行。如: 烟草叶内原生质体, 40℃处理期间, 有二种碱性的短命Hsp是只在热击的最初2小时内合成, 其他17种中性的比较稳定的Hsp则在整个40℃处理期间都合成, 作者指出这二种短命Hsp为调节多肽, 对正常蛋白合成的受抑制负有责任(Meyer和Chartier, 1983) [75]。酵母细胞, 40℃处理1—2小时后, 98、85、70KD Hsp的合成即达最强, 而后下降, 56、44、33KD Hsp的合成强度则上升较慢, 但在处理4小时期间没有回降(Weitzel等, 1987) [115]。小麦幼苗, 40℃处理, 开始4小时Hsp合成较少, 7小时后出现12种Hsp, 12小时后出现89、45、38KD Hsp, 作者指出7小时后合成的迟Hsp可能与增进甲硫氨酸掺入蛋白质有关(Necchi等, 1987) [70]。玉米根、Golgi体和内质网中有25、72KD Hsp, 质膜、线粒体、乙醛酸循环体中有18、29、72KD Hsp (Cooper和Ho, 1987) [30]。木豆, 由20℃升高至30℃, 诱导产生了10~12种Hsp, 其中18、60KD Hsp为线粒体起源, 其他大多为核起源(Kishore和Upadhyaya, 1988) [60]。以上事例表明热击的时间长短有可能影响诱导产生Hsp的种类, Hsp种类的不同也可能影响不同细胞器的功能。以上事例也提示了在热击处理开始后应该注意除温度以外的其他条件状况。

3. 细胞时期对热击效应的影响 细胞时期和热击效应间关系的报告, 植物材料比较少, 还需参考一下动物方面的报告。已有的报告如下: 烟草未同步悬浮培养细胞, 对数期细胞比静止期细胞更能对热击产生反应高速产生Hsp (Kanabus等, 1984) [53]。酵母细胞, Go期细胞对热击不敏感, G₁~S转折期细胞对热击敏感(Plesset等, 1987) [80]。CHO同步细胞, G₁~S转折期细胞, 43℃ 1小时对DNA合成启动和伸长起抑制作用(Cavis等, 1983) [32]。CHO细胞, 热击处理G₁期细胞仅使89KD, 110KD Hsp有少量增加, 热击处理S期细胞则除89KD, 110KD外还使70KD Hsp有显著增加, CHO细胞在S期对热击敏感(Rice等, 1986) [93]。四膜虫, 33.8℃ 50分钟显著促进组蛋白H₁的磷酸化, 作者还指出这种磷酸化是依赖于细胞周期的(Glover等, 1981) [44]。Hela细胞, 70KD Hsp与专一胞质蛋白质的结合受细胞时期的影响, S期细胞有较多种类的蛋白质与Hsp 70专一结合(Milarski等, 1989) [70]。以上事例表明, 不同时期细胞对热击的反应是不同的。不分裂

静止细胞反应能力弱, 周期细胞中的 $G_1 \sim S$ 转折期至 S 期细胞对热击最敏感。因此在热击处理植物组织培养物时应注意材料是否处于活化状态或接近于活化启动状态。

4. 发育状况对热击效应的影响 一些研究报告指出发育状况对热击反应有显著影响。如: 高粱萌发种子, 吸胀初不能合成 Hsp, 吸胀开始后 16 小时时的热击只能一般降低胚中氨基酸的掺入, 不同系的起始合成 Hsp 的种子萌发时间是不同的 (Ougham 和 Stoddart, 1986) [183]。小麦萌发胚, 种子活力高的热击反应强, 吸胀早期和吸胀后期合成的 Hsp 还有量的区别 (Helm 等, 1989) [47]。菜豆叶片, 衰老时叶片对热击处理的反应能力下降 (Yordanov 和 Weis, 1984) [119]。以上事例看来活力强的材料热击反应能力强, 但是也有例外, 唐菖蒲小球茎是休眠材料比不休眠材料合成 Hsp 和抑制正常蛋白合成的能力更强些 (Ginzburg 和 Salomon, 1986) [42]。还有报告梨培养细胞对热击最敏感的时间是进入培养后的第 3 天, 与最活跃细胞分裂的时期相一致 (Wu 等, 1984) [118]。因此, 在进行培养物热击处理时还应注意材料的活性状况。又, 畸胎瘤未分化干细胞不能表达热击基因, 只有分化了的细胞簇才能对热击起反应 (Wittig 等, 1983) [117], 这一事实也值得予以注意。

5. 热击反应的器官专一性 如: 玉米, 热击处理能使大多数组织诱导合成典型的 Hsp, 但是确切的反应特征是因组织类型而异的, 如初生根延长区的反应能力就比成熟区强 (Cooper 等, 1984) [20]。玉米 5 天幼苗, 42℃ 1 小时后进行分析即有 Hsp 合成, 但不同器官所合成的 Hsp 是有区别的 (Baszczynski 和 Walden, 1983) [14]。Alahiotis (1983) [10] 指出热击反应是相似的, 但热击基因存在种内和种间差异。Mansfield 和 Key (1987) [12] 报告, 双子叶植物比单子叶植物含有更多可测出的低分子量的 Hsp。以上事实表明 Hsp 的产生有强的材料专一性, 因此, 在热击研究中实验材料选定后, 不要轻易更动材料。

6. 外源化学因素对热击效应的影响 如: 热击可以刺激藻状菌孢子萌发, 谷酰胺的供应对热击效应起增效作用 (Shehata 等, 1982) [100]。腐胺的供应会缩小热击对细菌蛋白质合成的抑制 (Miret 等, 1986) [77]。GA 的外源供应会增强绿豆对热击的反应 (Chen 等, 1986) [26]。KT 的供应可以完全消除热击对莴苣种子产生乙烯的抑制作用 (Khan 和 Prusinski, 1989) [57]。pp333 增强植物对热击的耐受能力 (Lee 等, 1985) [67]。pp333 增强水稻原生质体对热击的耐受能力 (郑康乐等, 1990) [3]。这一方面, 在用动物材料进行的试验中还有更多例子, 如: 葡萄糖的供应促进 L929 细胞对热击的反应 (Kasambalides 和 Lanks, 1983) [56]。因此热击处理应用于植物组织培养材料时, 应注意培养基成份的选择。在同一组试验中除必要外不应轻易更动培养基成份。

7. 可能产生 Hsp 的其他胁迫因子 Hsp 合成是热击反应的主要标志。Hsp 的多种多样功能是热击效应的主要基础。但是近年来一系列研究表明许多胁迫因子也会产生 Hsps 或 Hsp 样蛋白。因此研究热击效应时, 还应了解可能产生 Hsps 的其他胁迫因子, 以免其他胁迫因子的存在干扰我们对热击试验结果的分析。其他胁迫而能产生 Hsp 的, 举例如下: 大田生长的大豆在水份胁迫时会诱导产生 Hsp-mRNA, 这与田间水分不足时叶面升温有关 (Kimpel 和 Key, 1985) [68]。玉米中胚轴水份胁迫时可诱导积累 Hsp-mRNA (Heikila 等, 1984) [48]。田间水分不足导致棉花叶肉积累 96、87、72、63、45、36、22 KD Hsp 样多肽的积累 (Burke 等, 1984) [21]。methomyl (一种线虫剂) 诱导玉米幼苗合成 Hsp (Rees 等, 1989) [92]。这方面在动物材料还有不少例子, 如: Zn 污染 (Whelan 等, 1985) [116]

H₂O₂ (Love等, 1986^[70]; Courgeon等, 1988^[31]; Fornace Jr等, 1989^[30]), 等。因此, 在进行热击试验时, 如果不是有意安排, 应尽可能排除其他胁迫因子(包括抑制性药剂)的并存。

以上是我们对热击手段应用于植物组织培养的有效性和热击试验进行时应该注意的问题的一些粗浅的认识。由于我们自身在这方面的研究工作做得不多, 系统的研究还刚刚开始, 我们对热击应用基础研究的理解肯定还有不足之处, 还有待不断深入。

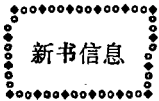
参 考 文 献

- (1) 周菊华, 梁海曼, 1990: 武汉植物学研究, 8: 87—100.
- (2) 张孔胤等, 1986: 遗传学报, 13: 266—267.
- (3) 郑康乐等, 1990: 鉴定会资料.
- (4) 崔元方等, 1986: 植物学报, 28: 582—588.
- (5) 黄 海, 1987: 植物生理学报, 13: 325—329.
- (6) 程井辰等, 1989: 中国细胞生物学会4th全国会议, 论文摘要汇编, 108.
- (7) 浅田浩二, 陈功祥, 1988: 蛋白质, 核酸, 酵素, 33: 1513—1521.
- (8) 饭田秀利, 1983: 生化学, 55: 302—309.
- (9) 纲野真一等, 1986: 植物组织培养, 3: 9—15.
- (10) Alahiotis SN, 1983: *Comp Biochem Physiol*, 75B: 379—387.
- (11) Altschuler M, Mascarenhas JP, 1985: *Plant Mol Biol*, 5: 291—298.
- (12) Arrigo A-P, 1983: *Nuol Acids Res*, 11: 1398—1404.
- (13) Augustin MA et al, 1985: *J Sci Food Agric*, 36: 1259—1265.
- (14) Baszczynski CL, Walden DB, 1983: *Can J Biochem Cell Biol*, 61: 395—403.
- (15) Baszczynski CL et al, 1982: *Can J Biochem*, 60: 569—579.
- (16) Belanger FC et al, 1986: *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 1354—1358.
- (17) Bensaude O et al, 1983: *Nature*, 305: 331—333.
- (18) Bird RC, Zimmerman AM, 1981: *Can J Biochem*, 59: 937—943.
- (19) Branno M et al, 1983: *Biochim Biophys Acta*, 741: 136—142.
- (20) Brodl MR, 1989: *Physiol Plant*, 75: 439—443.
- (21) Burke JJ et al, 1984: *Plant Physiol*, 75(1supp): 33, 184.
- (22) Caers M et al, 1985: *Plant Cell Physiol*, 26: 47—52.
- (23) Carrino JJ, Laffler TG, 1985: *J Cell Biol*, 100: 642—647.
- (24) Chen L-J, Luthe DS, 1987: *Plant Sci*, 48: 181—188.
- (25) Chen Y-M et al, 1986: *Physiol Plant*, 66: 595—601.
- (26) Chiang MS et al, 1985: *Can J Plant Sci*, 65: 1033—1037.
- (27) Chuong PV, Beversdorf WD, 1985: *Plant Sci Lett*, 39: 219—226.
- (28) Copper P, Ho T-HD, 1983: *Plant Physiol*, 71: 215—222.
- (29) Copper P et al, 1984: *Plant Physiol*, 75: 431—441.
- (30) Copper P, Ho T-HD, 1987: *Plant Physiol*, 84: 1197—1203.
- (31) Courgeon A-M et al, 1988: *Eur J Biochem*, 171: 163—170.
- (32) Davis RC et al, 1983: *Int J Radiat Biol*, 43: 379—390.

- (33) Duck N et al, 1989: *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 3674—3678.
- (34) Durley RC et al, 1984: *Plant Physiol*, 75(1 supp) : 13, 68.
- (35) Elliot DC, 1982: *Plant Physiol*, 69 : 1169—1172.
- (36) Eze JMO et al, 1983: *Physiol Plant*, 58 : 179—183.
- (37) Field RJ, 1981: *Ann Bot*, 48 : 33—39.
- (38) Flannery AV, Hill RS, 1988: *Exp Cell Res*, 177 : 9—18.
- (39) Fornace AJ et al, 1989: *Exp Cell Res*, 182 : 61—74.
- (40) Fourre JL, Lhoest J, 1989: *Plant Sci*, 61 : 69—74.
- (41) Garcia FG, Einset JW, 1983: *Ann Bot*, 51 : 287—295.
- (42) Ginzburg C, Salomon R, 1986: *Plant Physiol*, 81 : 259—267.
- (43) Givelberg A et al, 1984: *J Exp Bot*, 35 : 1754—1763.
- (44) Glover CVC et al, 1981: *Cell*, 23 : 73—77.
- (45) Harrington HM, Alm DM, 1988: *Plant Physiol*, 88 : 618—628.
- (46) Heikkila JJ et al, 1984: *Plant Physiol*, 76 : 270—274.
- (47) Helm KW et al, 1989: *Plant Physiol*, 90 : 598—605.
- (48) Hense-LaRosa K et al, 1987: *Plant Physiol*, 85 : 4—7.
- (49) Hwang CH, Zimmerman J, 1989: *Plant Physiol*, 91 : 552—558.
- (50) Iida H, Yahara H, 1984: *J Cell Biol*, 98 : 199—207.
- (51) Janardhanarao G et al, 1985: *Photosynthetica*, 18 : 596—599.
- (52) Kamada H, Harada H, 1981: *Plant Cell Physiol*, 22 : 1423—1429.
- (53) Kanabus J et al, 1984: *Plant Physiol*, 73 : 639—644.
- (54) Kapoor M, Lewis J, 1987: *Biochem Biophys Res Commun*, 147 : 904—910.
- (55) Kaul K, 1986: *Am J Bot*, 73 : 242—245.
- (56) Kasambalides EJ, Lanks KW, 1983: *J Cell Physiol*, 114: 93—98.
- (57) Khan AA, Prusinski J, 1989: *Plant Physiol*, 79 : 735—737.
- (58) Kimpel JA, Key JL, 1985: *Plant Physiol*, 79 : 672—678.
- (59) Kirk DL, Kjrck MM, 1985: *Science*, 231 : 51—54.
- (60) Kishore R, Upadhyaya KC, 1988: *Plant Cell Physiol*, 29 : 517—521.
- (61) Klein JD, Ferguson IB, 1987: *Plant Physiol*, 84 : 153—156.
- (62) Krishnan M et al, 1989: *Plant Physiol*, 90 : 140—145.
- (63) Kurtz S, Lindquist S, 1985: *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:
- (64) Kuznetsov VV et al, 1988: 13th Int Confer Plant Growth Substan, Jul 17—22, 1988, .p38, 130.
- (65) Lai Y-K et al, 1988: *J Phycol*, 24 : 509—514.
- (66) Law DM, 1987: *Physiol Plant*, 70 : 626—632.
- (67) Lee EH et al, 1985: *Plant Physiol*, 77(supp): 135, 732.
- (68) Lin C-Y et al, 1985: *Plant Cell Physiol*, 26 : 1493—1498.
- (69) Lin C-Y et al, 1984: *Plant Physiol*, 74 : 152—160.
- (70) Love JD et al, 1986: *J Cell Physiol*, 126 : 60—68.
- (71) MacCarthy JJ et al, 1980: *J Exp Bot*, 31 : 1315—1325.
- (72) Mansfield MA, Key JL, 1987: *Plant Physiol*, 84 : 1007—1017.

- (73) Mansfield MA, Key JL, 1988: *Plant Physiol*, 86 : 1240—1246.
- (74) Marrison N et al, 1986: *Plant Sci*, 45 : 19—25.
- (75) Meyer Y, Chartier Y, 1983: *Plant Physiol*, 72 : 26—32.
- (76) Milarski KL et al, 1989: *J Cell Biol*, 108 : 413—423.
- (77) Miret JJ et al, 1986: *FEBS Lett*, 200 : 117—122.
- (78) Munyon IP et al, 1989: *In Vitro*, 25: 293—296.
- (79) Necchi A et al, 1987: *Plant Physiol*, 84 : 1378—1384.
- (80) Nieto-Sotelo J, Ho T-HD, 1986: *Plant Physiol*, 82 : 1031—1035
- (81) Nover L et al, 1986: *Eur J Biochem*, 160: 297—304.
- (82) Ockendon DJ, 1984: *Ann Appl Biol*, 105 : 285—291.
- (83) Ougham HJ, Stoddart JL, 1986: *Plant Sci*, 44 : 166—167.
- (84) Pearce D et al, 1988: 13th Int Confer Plant Growth Substan, Jul, 17—22, p76, 360.
- (85) Pekkala D et al, 1984: *Mol Cell Biol*, 4 : 1198—1205.
- (86) Pelham NRB, 1986: *Cell*, 46 : 959—961.
- (87) Pence VG, Caruse JL, 1986: *Plant Sci*, 46 : 233—237.
- (88) Pfeffer U, Schulz-Harder B, 1985: *Z Naturforsch*, 40 : 26—28.
- (89) Plesset J et al, 1987: *J Bacteriol*, 169 : 779—784.
- (90) Pouchelet M et al, 1983: *Exp Cell Res*, 149 : 451—459.
- (91) Radin JW, Hendrix DL, 1986: *Plant Sci*, 45 : 37—43.
- (92) Rees CAB et al, 1989: *Plant Physiol*, 90 : 1256—1261.
- (93) Ricci G et al, 1986: *J Cell Physiol*, 126 : 291—297.
- (94) Rincon M, Hanson JB, 1986: *Physiol Plant*, 67 : 576—583.
- (95) Ritosa FM, 1962: *Experientia*, 18 : 571—573.
- (96) Saha S et al, 1983: *Curr Sci*, 52 : 88—89.
- (97) Scharf K-D, Nover L, 1987: *Biochim Biophys Acta*, 909 : 44—57.
- (98) Scharf K-D, Nover L, 1982: *Cell*, 30 : 427—438.
- (99) Schlesinger MJ, 1986: *J Cell Biol*, 103 : 321—325.
- (100) Shehata AE et al, 1982: *Ain Sshams Univ Fac Agric Res Bull*, 0 : 1—18.
- (101) Shu SC et al, 1988: *Res Rept Rural Dev Admin, Biotechnol Korea Repub*, 30 : 26—31.
- (102) Simon JA et al, 1985: *Cell*, 40 : 805—817.
- (103) Stermer BA, Hammerschmidt R, 1984: *Physiol Plant Pathol*, 25 : 239—250.
- (104) Stevenson MA et al, 1986: *Biochem Biophys Res Commun*, 137 : 826—833.
- (105) Sung ZR, okimoto R, 1981: *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 3683—3687.
- (106) Suss K-H, Yordanov IT, 1986: *Plant Physiol*, 81 : 192—199.
- (107) Tanguay RM, 1983: *Can J Biochem Cell Biol*, 61 : 387—394.
- (108) Tantonnes TE et al, 1989: *Theor Appl Genet*, 78 : 531—536.
- (109) Thomas SR, Lengyel JA, 1986: *Dev Biol*, 115 : 434—438.
- (110) Thompson JA et al, 1987: *J Plant Physiol*, 127: 367—370.
- (111) Ueng PP, Daly JM, 1985: *Plant Cell Physiol*, 26 : 77—87.

- (112) Van der Ploeg LHT et al, 1985: *Science*, 228 : 1443—1445.
 (113) von Arnold S, Gronroos R, 1986: *Bot Gaz*, 147 : 425—431.
 (114) von Bergenen Henegouwen PMP, Linneman S, 1987: *Exp Cell Res*, 171 : 367—375.
 (115) Weitzel G et al, 1987: *Exp Cell Res*, 170 : 64—79.
 (116) Whelan SA, Hightower LE, 1985: *J Cell Physiol*, 122 : 205—209.
 (117) Wittig S et al, 1983: *Dev Biol*, 96 : 507—514.
 (118) Wu M-T et al, 1984: *Plant Physiol*, 74 : 944—946.
 (119) Yordanov IT, Weis E, 1984: *Z Pflanzenphysiol*, 113 : 383—394.
 (120) Zapata FJ, Torrizo LB, 1986: *Int Rice Res Newslett*, 11 : 25—26.
 (121) Zuker C et al, 1983: *Cell*, 34 : 997—1005.



研究、开发利用植物资源的工具书 《广西植物志》第一卷出版

《广西植物志》记载广西野生及习见栽培的维管束植物, 包括蕨类植物、裸子植物和被子植物, 分为四卷出版。由李树刚、梁畴芬两教授编辑, 并有王文采、路安民、张宏达、陈德昭、高蕴璋、李秉滔、莫新礼、方鼎、高成芝、陈秀香、毛宗铮、韦裕宗、韦发南等教授、学者参加撰写的本志第一卷已由广西科学技术出版社出版。

《广西植物志》第一卷收载裸子植物和被子植物的木兰科到桃金娘科(按哈钦松系统), 共48科、353属、1380种、3亚种、121变种、17变型, 对科、属、种(含亚种、变种和变型)的名称、形态特征(着重对比特征)、产地、生境、分布及经济用途等均有扼要记述, 科下有比较详细的分属和分种检索表, 并有植物形态特征比较图或全图的图版356幅(含982种), 占收载植物种类总数的64.6%, 以便认辨。本志可供植物学、农业、林业、园艺、医药、轻工等部门工作者及有关的教学、生产部门参考应用。

本志为16开本, 共157万字, 975页, 每本定价平装30元, 精装35元。欲购此书者, 可向当地新华书店购买或向广西植物研究所分类室邮购, 每本加收挂号邮费5元。书款可信汇或邮汇到广西桂林市雁山广西植物研究所分类室, 邮政编码541006, 开户银行: 广西桂林市农行雁山营业所, 帐号43103, 请写清楚购买书名、册数及购买人姓名、邮址。